

Typenbestimmungen bei Tuberkelbakterien
mit Hilfe der hohen Schicht

Peter Wapler

1961



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Auß dem Tierhygienischen Institut der
Universität München

Vorstand: Prof. Dr. A. Meyn

Typenbestimmungen bei Tuberkelbakterien mit Hilfe der hohen Schicht

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

von

Peter Wapler

aus

Steinenbronn (Wttbg.)

München 1961

Aus dem physiologischen Institut der

Universität München

/Lehrstuhl: Prof. Dr. A. Meyer

Typenbestimmungen bei Tuberkulosen mit Hilfe der hohen Schicht

Abhandlung

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät der

Universität München



von

Peter Weigert

aus

Leiden (Niederlande)

München 1901

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. A. Meyn

Referent: Prof. Dr. A. Meyn

Tag der Promotion: 24. 2. 1961

I. Einleitung.

Die Differenzierung der Menschen-, Rinder- und Geflügeltuberkelbakterien ist auch heute noch eine komplizierte und langwierige Arbeit, die mit entsprechend hohen Kosten verbunden ist. Man hat deswegen immer wieder versucht, einfachere Methoden auszuarbeiten. Unter anderem hat *Lebek* (9) eine Methode der Typendifferenzierung auf Grund unterschiedlicher Sauerstoffbedürfnisse vorgeschlagen.

Herr Prof. Dr. A. *Meyn* hat mir die Aufgabe gestellt, das Wachstum der Tuberkelbakterien in der sog. „Hohen Schicht“ zu beobachten und mit der Prüfung der Methode von *Lebek* einen Beitrag zur Typendifferenzierung zu leisten.

II. Literatur..

Typen der Tuberkelbakterien.

Als im Jahre 1882 der Tuberkuloseerreger von Robert Koch (12) gefunden wurde, war man der Meinung, dieser Erreger sei die Ursache der menschlichen und der tierischen Tuberkulose. Zwei Jahre später wiesen Nocard, Roux, Rivolta, Straus u. a. (10) auf Unterschiede zwischen dem Erreger der Geflügeltuberkulose und der Säugetiertuberkulose hin.

Weber, Koch, Bofinger und Rabinowitsch (10) gelang es, den Erreger der Geflügeltuberkulose auf Grund seines abweichenden Verhaltens in Kultur- und Tierversuch von den anderen Tuberkuloseerregern abzutrennen. Im Tierversuch war der Erreger der Geflügeltuberkulose hochpathogen gegenüber Kaninchen und Hühnern, aber nicht pathogen gegenüber Meerschweinchen. Die Säugetiertuberkelbakterien waren dagegen hochpathogen gegenüber Meerschweinchen, aber nicht pathogen gegenüber Hühnern.

Viele Jahre später gelang auch die Differenzierung der Säugetiertuberkelbakterien. Schon vor der Entdeckung des Tuberkuloseerregers hatten verschiedene Forscher festgestellt, daß Kälber, Schweine und Ziegen an Tuberkulose erkrankten, wenn sie mit Milch und Lungenstückchen perlsüchtiger Rinder gefüttert wurden, daß sie aber nach Verfütterung von tuberkulösem menschlichen Material nicht erkrankten.

Villemin und Baumgarten (5) stellten auch schon Unterschiede in der Pathogenität für das Kaninchen fest, je nachdem, ob das tuberkulöse Material vom Menschen oder vom Rind stammte. Man erklärte diese Beobachtungen mit der natürlichen Variabilität desselben Erregers.

1898 trennte dann Theobald Smith (5) auf Grund morphologischer, kultureller und tierpathogener Unterschiede den Erreger der menschlichen Tuberkulose von dem Erreger der Perlsucht des Rindes ab.

Koch und Schütz (5) unternahmen daraufhin weitere Untersuchungen bei Rindern. Dabei stellten sie fest, daß die Rinder empfänglich waren für den Erreger der Rindertuberkulose, aber unempfindlich für

den Erreger der menschlichen Tuberkulose. Auf dem Tuberkulosekongreß 1901 in London vertrat *Koch* (5) deshalb die Meinung, daß die menschliche Tuberkulose auf das Rind nicht übertragen werden kann. Er schloß aber daraus auch, daß die Rindertuberkulose für den Menschen völlig ungefährlich sei. Diese Auffassung von der Unschädlichkeit der Rindertuberkulose für den Menschen wurde später widerlegt. Zur Unterscheidung zwischen Typus humanus und Typus bovinus empfahl *Koch* den Rinderinfektionsversuch.

Nach dem Vorschlag von *Kossel* und *Heuß* (10) sprach man damals von dem Typus humanus, Typus bovinus und Typus gallinaceus des *Bacterium tuberculosis*. Später wurde dann der Geflügeltuberkuloseerreger von den Erregern der Säugetiertuberkulose abgetrennt und als eigene Art, *Mycobacterium avium*, bezeichnet. Als Erreger der Säugetiertuberkulose galt das *Mycobacterium tuberculosis*, bei dem man eine Variatio hominis und eine Variatio bovis unterschied. Nach der neuesten Systematik werden auch Menschen- und Rindertuberkelbakterien als zwei verschiedene Arten angesehen und als *Mycobacterium tuberculosis* bzw. *Mycobacterium bovis* bezeichnet. Die Differenzierung dieser *Mycobacterien* erfolgt kulturell und im Tierversuch.

a) Die Typendifferenzierung durch den Tierversuch.

Der Tierversuch war die erste Methode der Typendifferenzierung. Durch ihn gelang es, ein unterschiedliches Verhalten in der Pathogenität der Tuberkuloseerreger festzustellen und den Typus gallinaceus von den Säugetiertuberkelbakterien abzutrennen. Das Meerschweinchen hatte sich als resistent gegenüber dem Erreger der Geflügeltuberkulose gezeigt, war aber sehr empfindlich gegenüber der Säugetiertuberkulose. Hühner dagegen waren gegenüber den Säugetiertuberkelbakterien unempfindlich, erkrankten aber, ebenso wie das Kaninchen, nach Infektion mit Geflügeltuberkelbakterien.

Auch die Unterscheidung zwischen dem Typus humanus und dem Typus bovinus gelang durch den Tierversuch.

Koch und *Schütz* (10) benutzten zur Differenzierung den Impfversuch bei Rindern. Diese waren sehr

empfindlich für den Typus bovinus, dagegen unempfindlich für den Typus humanus. Als Ersatztier für das Rind empfahl *Koch* (10) das Kaninchen. Die englische und die deutsche Tuberkulosekommission (8) benutzten zur Typendifferenzierung Kälber, Kaninchen und Meerschweinchen. Dabei erwies sich der Kaninchenversuch als besonders zuverlässig. Einem Kaninchen wurden zu diesem Zweck 10 mg einer jungen Tuberkelbakterienkultur subkutan injiziert. Bei Injektion von humanen Tuberkelbakterien fand man nach einiger Zeit bei der Sektion einzelne fibröse Knoten an den dorsalen Lungenabschnitten und möglicherweise einen örtlichen Abszeß in der Lunge. Bei Applikation von bovinen Tuberkelbakterien kam es zu einer Generalisation der Tuberkulose. Die Kaninchen magerten zusehends ab und verendeten nach 3–4 Wochen. Die Sektion ergab tuberkulöse Prozesse, besonders in der Lunge und den Nieren, mit Beteiligung der regionären Lymphknoten, sowie häufig auch in Leber und Milz (19).

Manche Stämme nehmen eine Zwischenstellung zwischen dem humanen und bovinen Typ in der Pathogenität gegenüber dem Kaninchen ein. Dadurch bleibt der Kaninchenversuch unsicher. Auch individuelle Schwankungen in der Empfänglichkeit der Kaninchen spielen eine Rolle.

Um diese Fehlerquellen auszuschalten und auch wegen der Kostspieligkeit des Tierversuchs ist man immer bestrebt gewesen, kulturelle Methoden der Typendifferenzierung zu finden, die neben der Zuverlässigkeit auch schneller und billiger sind als der Tierversuch.

b) Die kulturelle Typendifferenzierung.

Allgemeines:

Robert Koch befaßte sich in seiner ersten Veröffentlichung über die Aetiologie der Tuberkulose im Jahre 1882 auch mit der kulturellen Züchtung der Tuberkelbakterien. Er benutzte dazu Serum vom Schaf oder Rind, das er sechs Tage lang täglich eine Stunde auf 58° C und dann mehrere Stunden auf 65° C erhitzte, bis es erstarrte. *Koch* stellte auch fest, daß sich das Serum anderer Tierarten als Nährboden eignete

und daß die Tuberkelbakterien auf Nährböden wuchsen, die aus Agar-Agar mit Zusatz von Fleischbrühe und Pepton hergestellt waren. Das Serumverfahren war sehr ungenau, weil infolge der nicht ausreichenden Sterilisation und der Verunreinigung des Impfmateri als oft andere Keime wuchsen, die das Wachstum der Tuberkelbakterien unterdrückten.

Mit dem Zusatz von Glycerin (6–8 %) zum Serum war ein weiterer Fortschritt zur kulturellen Züchtung der Tuberkelbakterien gemacht. *Roux* und *Nocard* (6, 10) stellten fest, daß dadurch die Kulturen schneller wuchsen und nicht so schnell austrockneten. Später kamen andere Nährmedien dazu.

Durch diese Erkenntnisse angeregt, führten *Proskauer* und *Beck* (6) ausgedehnte Untersuchungen über die Ernährungsphysiologie der Tuberkelbakterien durch. Dabei suchten sie nach einem Nährmedium, daß größtenteils aus anorganischen Substanzen bestand.

Cabaldi (6) benutzte 1896 erstmals das Hühnerei für die Tuberkelbakterienzüchtung. Daraufhin wurde der Hühnereinährboden weiter entwickelt.

Dorset (6) nahm koaguliertes Ei und *Lubenau* (6) einen Nährboden aus 50 % Eigelb und 50 % Glycerinbouillon. Auch der Glyceringehalt des Nährbodens erwies sich als ausschlaggebend für die Züchtung.

So stellte *Siebert* (6) fest, daß die Kulturen des Typus *humanus* mehr Glycerin benötigen als die des Typus *bovinus*.

Rislakki-Svanberg, *Wille*, *Griffith* und *Meyn* (10) fanden dann, daß die Empfindlichkeit auf Glycerin als Typenmerkmal gewertet werden kann. Bovinkulturen werden durch Glycerin in der Entwicklung gehemmt, während Humanus- und Gallinaceuskulturen ausgezeichnet wachsen.

Alle Nährböden hatten zunächst den Nachteil, daß das Untersuchungsmaterial mit anderen Keimen vermischt war, die schneller wuchsen und so die Tuberkelbakterien in der Entwicklung unterdrückten. Um diesem Uebel abzuhelpen, setzte *Petroff* (6) einem Kalbfleischnährboden Gentianaviolett zu; *Petragnani* (6) benutzte Malachitgrün bei einem Nährboden, der aus Vollmilch, Pepton, Glycerin und Kartoffel bestand.

Das Kulturverfahren setzte sich aber erst dann durch, als es auch gelang, das Ausgangsmaterial gänzlich frei von Begleitkeimen zu machen. *Spengler* und *Twort* gelang dieses zum Teil bei Sputumuntersuchungen durch Zusatz von Formalin bzw. Erikolin.

Löwenstein und *Sumiyoschi* entdeckten, daß die Tuberkelbakterien gegen Säuren und Basen resistent sind. Sie behandelten das Untersuchungsmaterial mit Schwefelsäure und Natronlauge und erhielten so von anderen Keimen freie Kulturen.

Typendifferenzierung durch den Kulturversuch:

Schon 1887 kam es zur Abtrennung des Typus *galinaceus* von den Säugetiertuberkelbakterien auf Grund seines abweichenden Wachstums (10). Auf festen Nährböden wuchsen die Geflügeltuberkelbakterien nach 6 bis 8 Tagen, auf Glycerinagar bildeten sie einen schmierigen Belag und in Glycerinbouillon eine dünne Haut auf der Oberfläche.

Auf Unterschiede im Wachstum der beiden Säugetiertuberkelbakterienarten machte erstmals *Smith* aufmerksam. *Kossel*, *Weber* und *Heuß* (10) beschrieben dann genau die Unterschiede. Durch die Beschreibung war es möglich, schon damals eine Typendifferenzierung durchzuführen. Als Typenmerkmal wurde das schnelle und üppige Wachstum frischer Kulturen des Typus *humanus* und das langsame und spärliche Wachstum des Typus *bovinus* gewertet. Stämme, die auf glyzerinhaltigen Nährböden schnell und kräftig wuchsen, bezeichnete *Griffith* (8, 10) als eugonisch, Stämme, die auf glyzerinfreien Nährböden langsam wuchsen und auf glyzerinfreien Medien besser gediehen, als dysgonisch. Eugonische Stämme, die ein gelbbraunes Pigment bildeten, waren Stämme des Typus *humanus*, während die dysgonischen pigmentfreien Stämme dem Typus *bovinus* angehörten. *Griffith* (8, 10) machte gleichzeitig darauf aufmerksam, daß nur frisch isolierte Kulturen zur Typendifferenzierung verwendet werden können, weil nach längerer Züchtung auf Nährböden auch bovine Stämme eugonisch wachsen können. Sein Schema wurde von *Meyn* (10) folgendermaßen erweitert:

„Typus humanus: Ueppiges (eugonisches), trocken krümeliges, gelbliches Wachstum. Später Pigmentbildung. Erste Kolonien nach 2—3 Wochen sichtbar. Die Stämme wachsen auf glyzerinhaltigen Nährböden wesentlich besser als auf glyzerinfreien.

Typus bovinus: Zartes (dysgonisches), feuchtglänzendes, hellgelbes Wachstum. Keine Pigmentbildung. Erste Kolonien nach 4—8 Wochen sichtbar. Die große Mehrzahl der Stämme wächst in der Eikultur auf glyzerinhaltigen Nährböden schlechter als auf glyzerinfreien.

Typus gallinaceus: Gutes (eugonisches), feuchtglänzendes Wachstum. Einzelkolonien kugelig. Später Pigmentbildung. Erste Kolonien nach 2—3 Wochen sichtbar. Die Stämme wachsen auf glyzerinhaltigen Nährböden besser als auf glyzerinfreien.“

Mit Hilfe dieses Schemas und der Nährböden nach Petraghani, Löwenstein und Hohn gelingt es meistens, die Tuberkelbakterien zu differenzieren. Nur in besonderen Fällen muß noch auf den Tierversuch zurückgegriffen werden.

Wagner und Mitscherlich (11) entwickelten eine Methode, die sich auf die ernährungsphysiologischen Eigenschaften der Tuberkelbakterien stützt. Der Typus humanus verwertet mehr Glycerin unter Säurebildung als der Typus bovinus. Der Indikator Bromkresolpurpur ist im sauren Bereich gelblichgrün und im alkalischen Bereich violett. Der Typus humanus bewirkt auf diesem Bromkresolpurpurnährboden einen Farbumschlag von violett nach gelbgrün, während durch den Typus bovinus die violette Farbe des Nährbodens kaum verändert wird.

Mit einem anderen Nährboden erhielten Altevogt und Kuckheim (1) noch bessere Typendifferenzierungsergebnisse und schnelleres Wachstum. Ihr Nährboden bestand aus Hirnauszug, Lockemann's „Lösung D“, Serum-Albumin-Plasma, Kartoffelmehl, Agar, und als Indikatoren Bromkresolpurpur und Bromthymolblau.

Wagner, Thiel und Hensel (13) beschrieben ein weiteres Merkmal für die Typendifferenzierung, das sog. Kletterphänomen. Hierbei wachsen Typus humanus und Typus gallinaceus an der Wand der Ku-

turröhrchen in die Höhe, wenn der Feuchtigkeitsgehalt am Boden groß genug ist; dem Typus bovinus fehlt dieses Merkmal.

In jüngerer Zeit besonders beachtet wurde der von *Konno* eingeführte und von *Bönicke* und *Lisboa* (15) modifizierte Niazintest. Humane Tuberkelbakterien bilden viel Niazin, bovine Tuberkelbakterien wenig. Der Nachweis des Niazins wird mit Bromcyan oder Kaliumcyan geführt und erfordert deshalb einen Aufwand, der in kleinen Laboratorien gewöhnlich nicht aufgebracht werden kann.

Auch die Atmung der Tuberkelbakterien wurde zur Typendifferenzierung herangezogen. Angeregt durch die Untersuchungen und Beobachtungen von *Lange*, *Novy*, *Soule*, *Dieckmann*, *Menzel* und *Mohr* (3, 4) über die Atmung der Tuberkelbakterien unternahm *Lebek* (9) neuerdings Versuche mit der sog. „Hohen Schicht“. *Lange* (7) sprach schon 1927 die Vermutung aus, daß die Tuberkelbakterien eine unterschiedliche Anpassungsfähigkeit an den Sauerstoffgehalt besitzen und daß die bovinen Stämme mit weniger Sauerstoff auskommen als die humanen. *Dieckmann*, *Menzel* u. *Mohr* (3, 4) entwickelten dann eine geeignete Technik für die Messung des Sauerstoffverbrauchs. Ergebnisse von Versuchen mit dem Ziel, die optimale Sauerstoffkonzentration für das Wachstum der Tuberkelbakterien zu ermitteln, waren aber recht unterschiedlich: Während *Novy* und *Soule* (7) eine günstigste Sauerstoffkonzentration von 40-50% und eine Behinderung des Wachstums bei mehr als 70% feststellten, wies *Witte* ein vermindertes Sauerstoffbedürfnis des Typus bovinus und eine Verbesserung des Wachstums bei Sauerstoffentzug nach. Ähnlich verhielt es sich mit dem Kohlendioxidgehalt.

Corper, *Gauß* und *Rench* (7) ermittelten ein gutes Wachstum bei einem Kohlendioxydanteil von 0,04% und eine Wachstumsbehinderung bei über 6%. Dagegen fanden *Novy* und *Soule* (7) noch ein gutes Wachstum bei 90% Kohlendioxyd- und 10% Sauerstoffgehalt.

III. Eigene Untersuchungen

Lebek (9) hat bei Untersuchungen über das Sauerstoffbedürfnis von Tuberkelbakterien in der sog. „Hohen Schicht“ ein typisches Verhalten humaner und boviner Stämme festgestellt. Humane Tuberkelbakterien vermehrten sich vorwiegend an der Oberfläche bzw. in der obersten Schicht des in Röhrchen gegossenen Nährbodens, während Rindertuberkelbakterien weiter in die Tiefe wuchsen.

Herr Prof. Dr. A. *Meyn* stellte mir nun die Aufgabe, mit den im Tierhygienischen Institut der Universität München vorhandenen Tuberkelbakterienstämmen diese Methode der Typendifferenzierung zu prüfen.

A. Material und Methodik.

1. Für die Untersuchungen benutzte ich folgende Stämme der Tuberkelbakterien:

Mycobacterium tuberculosis

60	100 B	169
61	101 B	176
72	248	155
81	221	153
82	233	152 A
12	124 A	150 A
39	239	146 A
48	196	128
51	157	137 A
35	163	144 B
92	167 A	102
103 B	112 B	113 B
249	119 B	146
127	115	140
141	147 A	119
149	Standard TB I	

Mycobacterium bovis

BCG	21	168
Ravenel	48	152
254	88	139
261	83	160

201	85	244
204	221	277
182	97	272
158	109	261
167	166 B	185
97	161	168
117 B	225	519
17	147	22

Mycobacterium avium

252	258	235
240	234	1
W 3	191	5
623	211	131 A
32	99	12
11	27	10

2. Herstellung des Nährbodens:

Der Nährboden wurde nach Angaben von *Lebek* hergestellt. Verwendet wurde fester Sauton-Nährboden in der „Hohen Schicht“. Er enthält

Asparagin	0,4 g
K ₂ HPO ₄	0,05 g
Acidum citricum	0,2 g
MgSO ₄ : 6 H ₂ O	0,05 g
Eisenammoncitrat	0,005 g
Glyzerin DAB	6,0 g
Aqua bidest.	80,0 ml

(0,1 g Eisenammoncitrat werden in 20 ml Aqua bidest gelöst, davon 1 mal verwendet.)

Alle Substanzen außer Glyzerin werden in destilliertem Wasser gelöst, dann Glyzerin hinzugefügt und die Lösung mit n NaOH auf pH 7,2 eingestellt. Dann werden 2,0 g Agar (Difco-Bacto-Agar pulv.) dazugegeben. Nach einstündigem Erhitzen im Dampftopf unter mehrmaligem Schütteln ist der Nährboden nach Abkühlung gebrauchsfertig.

Nun wird 0,5 ml inaktiviertes Rinderserum in Reagenzröhrchen pipettiert und in ein Wasserbad von 50°C gestellt. Zu dem Serum werden 4,0 ml des verflüssigten 50° C warmen Sauton-Nährbodens gegeben. Durch Hin- u. Herneigen des Röhrchens werden Serum und Nährboden gründlich durchmischt. Zum Schluß wird in den

noch flüssigen Nährboden 0,5 ml einer homogenen Bakteriensuspension, die in 1 ml etwa 4 mg Mycobacterien enthält, gegeben. Nach Durchmischung läßt man den Agar bei Zimmertemperatur erstarren und bebrütet ihn anschließend im Brutschrank bei 37° C.

Bei der Herstellung des Nährbodens erwies sich verschiedentlich das einstündige Erhitzen im Dampftopf als unzureichend, denn bei den ersten Versuchen war der Nährboden mit Sporenbildnern stark verunreinigt. Deshalb sterilisierte ich späterhin den Nährboden bei 125° C im Autoklaven.

3. Herstellung der Bakteriensuspension:

Eine gut gefüllte Oese Tuberkelbakterien wird in ein steriles Zentrifugenglas gebracht und mit einem sterilen Reagenzglas als Pistill zu einer homogenen Paste verrieben. Dann wird mit einer Pipette so viel destilliertes Wasser hinzugegeben, bis die Suspension die gewünschte Dichte besitzt. Als Vergleich diente die Trübung eines Röhrchens, das eine Suspension von 4 mg Mykobakterien (Feuchtgewicht) in 1 ml Aqua dest. enthielt.

4. Praktische Durchführung der Versuche:

Nach Herstellung und Sterilisation des Nährbodens kühlte ich ihn langsam unter heißem Wasser bis auf ca. 40° C ab, pipettierte dann 4,0 ml in Reagenzröhrchen in ein Wasserbad von 50° C. 0,5 ml steriles inaktiviertes Rinderserum pipettierte ich auch in Reagenzröhrchen und stellte sie ebenfalls in das Wasserbad.

Zur Herstellung der Bakteriensuspension bereitete ich die Mörser folgendermaßen vor: Ein Reagenzglas wurde mit Zellstoff und Leukoplast so umwickelt, daß es fest in einem dickwandigen Zentrifugenglas saß. Dann wurde das Ganze im Autoklaven sterilisiert.

In diesen Mörser verbrachte ich schnell unter Herausnahme des Pistills eine gut gefüllte Oese der Bakterien, die ich ohne Wasserzusatz auf dem Boden des Zentrifugenbechers zu einer Paste verrieb. Zu dieser Paste gab ich dann so viel destilliertes Wasser, bis die gewünschte Dichte erreicht war. Das Pistill wechselte ich gegen einen Stopfen aus, weil sich der Zen-

trifugenbecher dann besser in eine Hand nehmen und auch von derselben Hand öffnen läßt. Dann gab ich das Rinderserum zu dem Nährboden und dazu 0,5 ml der Bakteriensuspension, schloß das Röhrchen und vermischte Nährboden, Serum und Bakterien durch Hin- und Herneigen. Nach Abkühlung tränkte ich den Stopfen in Paraffin und stellte die Röhrchen dann in den Brutschrank.

B. Versuchsergebnisse.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt worden.

Lfd. Nr.	Species u. Bezeichnung der Stämme	Höhe d. Trübung in mm
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
1	60	5
2	61	5
3	72	6
4	81	5
5	82	6
6	12	5
7	39	2
8	48	6
9	51	nicht gewachsen
10	248	3
11	221	6
12	233	3
13	124 A	3
14	239	3
15	196	nicht gewachsen
16	157	3
17	163	5
18	167 A	3
19	169	3
20	176	3
21	155	5
22	153	nicht gewachsen
23	152 A	3
24	150 A	3
25	146 A	5

Lfd. Nr.	Species u. Bezeichnung der Stämme	Höhe d. Trübung in mm
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
26	35	6
27	128	6
28	137 A	5
29	144 B	3
30	114 B	nicht gewachsen
31	92	3
32	102	5
33	103 B	nicht gewachsen
34	106	6
35	110	3
36	112 B	6
37	113 B	6
38	249	5
39	119 B	4
40	146	3
41	127	4
42	115	4
43	140	3
44	141	3
45	147 A	nicht gewachsen
46	119	3
47	119	3
48	119	3
49	149	3
50	TB I	3
51	TB I	4
52	TB I	3
<i>Mycobacterium bovis</i>		
53	BCG	3
54	Ravenel	3
55	254	16
56	261	nicht gewachsen
57	201	16
58	204	17
59	182	nicht gewachsen
60	158	13
61	167	16
62	97	nicht gewachsen

Lfd. Nr.	Species u. Bezeichnung der Stämme	Höhe d. Trübung in mm
<i>Mycobacterium bovis</i>		
63	117 B	10
64	17	6
65	22	6
66	21	nicht gewachsen
67	48	5
68	88	8
69	83	nicht gewachsen
70	85	nicht gewachsen
71	221	6
72	97	11
73	109	9
74	225	15
75	147	nicht gewachsen
76	168	nicht gewachsen
77	152	7
78	139	6
79	160	6
80	244	9
81	277	8
82	277	7
83	277	9
84	272	9
85	272	9
86	272	10
87	261	9
88	261	9
89	261	10
90	185	5
91	185	7
92	185	7
93	168	8
94	168	6
95	168	6
<i>Mycobacterium avium</i>		
96	252	7
97	258	7
98	235	8
99	240	10

Lfd. Nr.	Species u. Bezeichnung der Stämme	Höhe d. Trübung in mm
100	234	12
101	623	2
102	211	6
103	131 A	7
104	32	2
105	99	6
106	12	3
107	12	3
108	11	2
109	27	3
110	10	6
111	10	6

Die Durchschnittshöhe der Trübung betrug bei

Typus humanus 4,1 mm

Typus bovinus 9,1 mm

Typus gallinaceus 5,6 mm

Die Trübung des Nährbodens war bedingt durch die Vermehrung der Tuberkelbakterien. Entsprechend der Wuchsfreudigkeit der verschiedenen Species trat die Trübung auch nach verschiedener Bebrütungszeit auf; so war bei den Stämmen des Typus gallinaceus eine Trübung schon nach 6—8 Tagen festzustellen, bei einigen Stämmen des Typus bovinus aber erst nach sechs Wochen.

Die Höhe der Trübung lag bei den Stämmen des Typus humanus zwischen 2 und 6 mm, davon bei 27 Stämmen zwischen 2 und 4 mm und bei 19 Stämmen zwischen 5 und 6 mm.

Bei den Stämmen des Typus bovinus lag die Höhe der Trübung zwischen 5 und 17 mm, davon bei 9 Stämmen zwischen 3 und 6 mm, bei 17 Stämmen zwischen 7 und 10 mm und bei 7 Stämmen über 10 mm.

Bei den Stämmen des Typus gallinaceus lag die Höhe der Trübung zwischen 2 und 12 mm, davon bei 10 Stämmen zwischen 2 und 6 mm, bei 5 Stämmen zwischen 7 und 10 mm und bei 1 Stamm über 10 mm.

IV. Diskussion der Ergebnisse.

L. Lange hatte schon 1927 auf den unterschiedlichen Sauerstoffbedarf der säugetierpathogenen Tuberkelbakterien hingewiesen. H. Braun und G. Lebek fanden dann, daß der Typus *humanus* optimal bei streng aeroben Verhältnissen wächst, während der Typus *bovinus* mit einer geringeren Sauerstofftension zum optimalen Wachstum auskommt. Dieses unterschiedliche Verhalten benutzte Lebek um festzustellen, ob sich auf Grund dessen eine Typendifferenzierung durchführen läßt. Er verwandte die Hohe Schicht für die Untersuchung des Sauerstoffbedarfs, denn in ihr stellt sich nach Erstarren der Agarsäule durch Diffusion des Luftsauerstoffs ein Sauerstoffgefälle ein, das an der Oberfläche der Agarsäule die Tension der Luft besitzt und sich nach der Tiefe zu immer mehr vermindert. Sind die Keime in dem Nährboden gleichmäßig verteilt, wachsen sie nur soweit, wie sie genügend Sauerstoff zum Wachstum vorfinden. Der Typus *humanus*, der mehr Sauerstoff benötigt als der Typus *bovinus*, wächst deshalb mehr an der Oberfläche der Hohen Schicht, während der Typus *bovinus* mit weniger Sauerstoff auskommt und nur in der Tiefe wächst.

Lebek erhielt eine Trübung des Nährbodens, die durch die Vermehrung der Tuberkelbakterien bedingt war, bei den humanen Stämmen in einer aeroben Zone von 4 bis 7 mm Tiefe, wobei die untere Grenze nicht scharf abschloß, sondern sich allmählich nach unten verlor. Bei einigen Stämmen war die Trübung anfangs 2–3 mm von der Oberfläche entfernt; nach mehreren Tagen weiterer Bebrütung trat sie aber auch darüber auf und war wie bei allen humanen Stämmen an der Oberfläche besonders stark.

Bei den bovinen Stämmen stellte Lebek das erste Wachstum in der Tiefe von 13–20 mm fest. Diese Wachstumszone war 1–2 mm hoch; er bezeichnete sie nach H. Braun als „positives Niveau“. Nach mehreren Tagen kam es auch zu einer Trübung in der Agarsäule oberhalb dieser Zone. Bei einigen Stämmen trat die tiefe Wachstumszone nicht auf, sondern in ihnen erfolgte die Trübung gleichmäßig bis in die Tiefe von 13–20 mm.

Der meßbare Unterschied in bezug auf das Sauerstoffoptimum der Tuberkelbakterien war also die unterschiedliche Tiefe der Trübung in der Hohen Schicht.

Meine Aufgabe war es nachzuprüfen, ob dieses unterschiedliche Verhalten zur Typendifferenzierung der Tuberkelbakterien herangezogen werden kann.

Bei meinen eigenen Versuchen fand ich, daß bei den meisten humanen und bovinen Stämmen ein eindeutiger Unterschied im Sauerstoffbedarf vorhanden ist.

Bei einigen Stämmen war dieser Unterschied allerdings nicht festzustellen, oder es war nur sehr gering. Das Wachstum der humanen Stämme erfolgt in der Regel bis in die Tiefe von 2–6 mm, wobei die Mehrzahl der Stämme die untere Grenze von 3 mm nicht überschritt. Diese Grenzen stimmen etwa mit den von *Lebek* ermittelten Grenzen von 4–7 mm überein.

Während *Lebek* bei den bovinen Stämmen eine untere Wachstumsgrenze zwischen 13 und 20 mm beobachtete, lag bei meinen Versuchen diese Grenze zwischen 5 und 17 mm, wobei aber die Mehrzahl der Stämme nicht weiter als 10 mm in die Tiefe wuchs.

Vergleicht man die Unterschiede in den unteren Wachstumsgrenzen bei *Typus humanus* (2–6 mm) und bei *Typus bovinus* (5–17 mm), so zeigt sich, daß bei 5 und 6 mm Tiefe eine Ueberschneidung der Grenzen erfolgt.

Noch undeutlicher wird das Bild, wenn man auch das Wachstum des *Typus gallinaceus* in der Hohen Schicht hinzuzieht. Hierbei beobachtete ich eine Trübung, deren untere Grenze zwischen 2 und 12 mm lag. Der Sauerstoffbedarf ist also bei den Geflügeltuberkelbakterien sehr unterschiedlich; sie weisen hinsichtlich des Sauerstoffoptimums keine charakteristischen Merkmale auf.

Die folgende Tabelle zeigt die Häufigkeit der Trübungstiefe bei den einzelnen Species.

Trübung in mm	Zahl der Stämme von			
	M.tuberculosis	M.bovis	M.avium	
2	×		XXX	
3	XXXXX XXXXX XX	XXXXX XXXXX		XXX
4	XXX			
5	XXXXX	XXXXX	XX	
6	XXXXX	XXXX	XXXXX	XX
7		XXXX		XXX
8		XXX		×
9		XXXXXX	XX	
10		XXX		×
11			×	
12				×
13			×	
14				
15			×	
16			XXX	
17			×	
insgesamt	45	33	16	

Diese Tabelle zeigt, daß zwar im allgemeinen der Sauerstoffbedarf der humanen Tuberkelbakterien größer ist als der der bovinen Stämme; sie wachsen mehr in den oberen Regionen der Hohen Schicht, während der Typus bovinus weiter in die Tiefe wächst. Der Unterschied ist aber nicht sehr groß, und in der Tiefe von 5—6 mm ist kein Unterschied vorhanden. In dieser Tiefe haben humane Stämme ihre untere und bovine Stämme ihre obere Grenze.

Die Tabelle zeigt außerdem die Unterschiedlichkeit im Sauerstoffoptimum der Geflügeltuberkelbakterien. Während sich dieses Optimum bei den säugetierpathogenen Tuberkelbakterien innerhalb kleinerer, für diese Species annähernd typischen Grenzen befindet, ist es bei den aviären Stämmen sowohl im humanen als auch im bovinen Bereich anzutreffen. Eine Trennung zwischen Geflügel- und Säugetiertuberkelbakterien ist aus diesem Grunde mit Hilfe der Hohen Schicht in der Regel nicht durchzuführen.

Die beiden alten bovinen Laborstämme BCG und Ravenel sind in der Tabelle nicht mit aufgeführt worden, um die Uebersicht nicht zu verwischen. Diese beiden Stämmen Stämme, die, im Gegensatz zu den übrigen dysgonisch wachsenden bovinen Stämmen, eugonisch wachsen, zeigten auch in der hohen Schicht ein den humanen Stämmen ähnliches Verhalten. Sie wuchsen schneller als die anderen bovinen Stämme und die Tatsache, daß ihre untere Wachstumsgrenze bei 3 mm lag, zeigt, daß sie auch in ihrem Sauerstoffbedürfnis den humanen Stämmen weitgehend gleichen.

Einige Stämme wurden in verschiedenen Suspensionsdichten dem Nährboden beigegeben, z. B. Nr. 83, 84 und 85. Dabei enthielt das mittlere Versuchsröhrchen (Nr. 84) die genormte Suspension, während das erste Röhrchen (Nr. 83) eine größere, und das dritte Röhrchen (Nr. 85) eine geringere Menge der Mykobakterien enthielt. Dabei war ein größerer Unterschied in der Tiefe der Wachstumszone nicht festzustellen. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, daß es weniger auf die Menge der Keime, sondern mehr auf ihre gleichmäßige Verteilung im Nährboden ankommt.

V. Zusammenfassung.

Nach der von *Lebek* beschriebenen Methode der „Hohen Schicht“ wurden von mir 46 Stämme des *Mycobacterium tuberculosis*, 33 Stämme des *Mycobacterium bovis* und 16 Stämme des *Mycobacterium avium* untersucht. Dabei stellte ich fest:

1. Ein unterschiedliches Sauerstoffbedürfnis und damit ein unterschiedliches Tiefenwachstum zwischen Menschen- und Rindertuberkelbakterien ist in der „Hohen Schicht“ im allgemeinen vorhanden.
2. Einige Stämme des *Mycobacterium bovis* machen aber davon eine Ausnahme. 9 der 33 Stämme von *Mycobacterium bovis* vermehrten sich auch im Wachstumsbereich des *Mycobacterium tuberculosis*.
3. *Mycobacterium avium* wuchs sowohl im Bereich der Menschen- als auch im Bereich der Rindertuberkelbakterien.
4. Die Methode der „Hohen Schicht“ wird für die Unterscheidung von Menschen- und Rindertuberkelbakterien als brauchbar angesehen. Zur Sicherung des Ergebnisses sollten aber gleichzeitig auch noch andere Differenzierungsverfahren herangezogen werden.

VI. Literaturverzeichnis.

1. Altevogt, R. u. B. Kuckheim:
Ein neuer Versuch zur Typendifferenzierung
von Tuberkelbazillen.
Zbl. Bakter. I, Org. **162**, 90 (1955).
2. Braun, H. u. G. Lebek:
Zur Biologie des Typus humanus und bovinus
des Myobacterium tuberculosis.
Vortrag, gehalten an der Tagung der Oesterr.
Ges. f. Mikrobiol. in Semmering am 24. 2. 1958.
Zbl. f. Bakter. I. Abt. Orig. **172**, 519 (1958).
3. Diekmann, H. u. G. Menzel:
Der Gastoßwechsel der Tuberkelbazillen.
I. Die Technik der Bestimmung des O₂-Ver-
brauchs von Tuberkelbazillen.
Z. Hyg. **113**, 709 (1932)
4. Dieckmann, H. u. H. Mohr:
Der Gastoßwechsel der Tuberkelbazillen.
II. Der O₂-Verbrauch von Tuberkelbazillen in
Abhängigkeit v. physikalisch-chemischen Um-
weltsbedingungen.
Zbl. Bakter. I. Orig. **129**, 185 (1933).
5. Gottsacker, E.:
Die Kultur des Erregers der Tuberkulose. Die
Differenzierung der Typen auf Eigelbnähr-
böden.
Zbl. Bakter. I. Orig. **156**, 351 (1950/51).
5. Gottsacker, E.:
Die Entwicklung der Kultur des Erregers der
Tuberkulose von 1882 bis heute.
Zbl. Bakter. 1. Abt. Ref. **147**, 196 (1949).
7. Haefliger, E.:
Untersuchungen über das Zonenwachstum der
Tuberkelbazillen in halbstarren Nährböden
nach L. Lange.
Zbl. Bakter. I. Orig. **125**, 222 (1932).
8. Jensen:
Reinzüchtung und Typenbestimmung von Tu-
berkelbakterienstämmen.
Zbl. Bakter. I. Orig. **125**, 222 (1932).

9. Lebek, G.:
Ueber den Nachweis des unterschiedlichen
Sauerstoffoptimums des humanen und bovi-
nen *Mycobacterium tuberculosis*.
Zbl. Bakter. I. Orig. **173**, 581 (1958).
10. Meyn, A.:
Nachweis und Typendifferenzierung der Tü-
berkelbakterien.
Berlin. München. Tierärztl. Wochenschr. **1941**,
S. 607.
11. Mitscherlich, E.:
Die Differenzierung frisch isolierter Stämme
von *Mycobacterium tuberculosis hominis* und
bovis im Kultur- und Kaninchenversuch.
Zeitschr. f. Hyg. **134**, 375 (1952).
12. Rolle, M.:
Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre.
Stuttgart, 1949.
13. Wagener, K., W. Thiel u. L. Hensel:
Das Kletterphänomen, ein kulturelles Art- und
Typenmerkmal der Tuberkelbakterien.
Zbl. Bakter. I. Orig. **167**, 291, (1950).
14. Wolters, K. L. u. H. Dehmel:
Zur Züchtung und Differenzierung der Tuber-
kelbazillen.
Zbl. Bakter. I. Orig. **117**, 412 (1930).
15. Bönicke, R. u. B. P. Lisboa:
Neuere chemische Verfahren zum Nachweis
der Niacinbildung der Tuberkelbakterien und
ihre Bedeutung für die Typendifferenzierung.
Tuberkulosearzt **12**, 380 (1958).

Herrn Prof. Dr. A. *Meyn* sage ich an dieser Stelle meinen Dank für die freundliche Ueberlassung des Themas.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Dr. *Th. Schließer* für die jederzeit gewährte Hilfe und seine Ratschläge bei der Gestaltung der Arbeit.

Lebenslauf.

Am 15. Juni 1935 wurde ich als Sohn des Rechtsanwalts Otto Wapler und dessen Ehefrau, der Ärztin Dr. Gertraud Wapler, geb. Bleß, in Wittenberg (Elbe) geboren,

Von 1941 bis 1948 besuchte ich die Volksschule in Lenzen (Elbe) und anschließend die Oberschule in Wittenberge. 1952 flüchtete unsere Familie in die Bundesrepublik. 1955 machte ich am Robert-Mayer-Gymnasium in Heilbronn (Neckar) das Abitur. Im Mai 1955 begann ich das Studium der Tiermedizin in München, das ich dort im Mai 1960 mit dem Staatsexamen beendete.

